

Министерство образования и науки Самарской области
государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение
Самарской области «Усольский сельскохозяйственный техникум»

Дата 25.05.2020

Дисциплина: Основы микробиологии

Преподаватель: Торхова О.И. эл.почта: torhova1958@yandex.ru

Специальность 36.02.01 Ветеринария

Курс 2 группа 21В

Урок № 24 Лабораторная работа №9

Тема: Техника посева вирусов на куриные эмбрионы.

Многие вирусы, поражающие человека и животных, могут в большей или меньшей степени размножаться в курином эмбрионе. Наличие плотной скорлупы защищает эмбрион от попадания микроорганизмов из внешней среды.

Метод культивирования вирусов в куриных эмбрионах используют при лабораторной диагностике вирусных инфекций, а также для изготовления вирусных вакцин и диагностических препаратов. Но этот метод имеет недостатки: 1) невозможно наблюдать в динамике за патологическими изменениями, происходящими в эмбрионе после заражения его вирусом; 2) при вскрытии эмбриона, зараженного вирусом, часто не обнаруживается видимых изменений и приходится выявлять наличие вируса в тканях, в жидкостях эмбриона, пользуясь другими вирусологическими методами (например, реакцией гемагглютинации); 3) метод культивирования в куриных эмбрионах пригоден не для всех вирусов. Несмотря на имеющиеся недостатки метод сравнительно прост, удобен и дешев и широко используется в вирусологических исследованиях. Наибольшее значение он имеет при работе с ортомиксовирусами, герпесвирусами, поксвирусами.

1.3.1. Строение куриного эмбриона

Куриный эмбрион покрыт известковой оболочкой – скорлупой, к которой изнутри примыкает скорлупная оболочка. В тупом конце яйца она раздваивается и заключает в себе воздушное пространство. Под скорлупной оболочкой находится хорионаллантоисная оболочка, в тупом конце яйца она проходит по внутренней стороне скорлупной оболочки, замыкающей воздушное пространство, эта оболочка богата кровеносными сосудами и служит эмбриону органом дыхания. Изнутри к ней прилегает аллантоисная полость, которая является органом выделения и защищает зародыш от высыхания и травм. Аллантоисная полость окружает зародыш, находящийся в полости амниона, которая наполнена околоплодной жидкостью. Через желточный канатик зародыш соединён с желточным мешком – основным источником питательных веществ.

Для успешного культивирования вирусов в организме развивающихся куриных эмбрионов требуется определённый температурный режим (36° - 38°), влажность (50-70%), а также достаточная вентиляция. Заражают куриные эмбрионы определённого возраста, инкубированные от 6 до 13 дней в зависимости от вида вирусов и метода заражения. Необходимо подготовить: подставку для яйца, пузырьки со спиртом и йодом, пробирку со стерильным парафином, покровные стёкла, пакетики стерильной ваты и марли, завёрнутую в бумагу стерильную посуду, стерильные шприцы, иглы, пинцеты, препаровальные иглы. Инструменты помещают в стаканчик со спиртом, где они находятся в течение всей работы, перед каждой манипуляцией их дополнительно стерилизуют обжиганием в пламени горелки. Руки перед работой тщательно моют, рекомендуется надеть маску из марли.

Для работы отбирают жизнеспособные эмбрионы, просвечивая инкубированные яйца в овоскопе. Жизнеспособный эмбрион подвижен, кровеносные сосуды оболочки заполнены кровью. Отобранные яйца тщательно дезинфицируют на тупом конце (или на боковой стороне яйца): скорлупу протирают спиртом, смазывают йодом, повторно обрабатывают спиртом и обжигают.

1.3.2. Заражение куриного эмбриона на хорионаллантоисную оболочку

Для заражения используют куриные эмбрионы 10-12-дневного возраста. Основные этапы заражения:

1. Яйцо помещают на подставку в вертикальном положении так, чтобы воздушный мешок находился наверху, проводят стерилизацию скорлупы на тупом конце яйца.
2. Над центром воздушного мешка делают прокол скорлупы с помощью препаровальной иглы.
3. в образовавшееся отверстие вводят браншу ножниц и вырезают окно в скорлупе около 1,5 см в диаметре.
4. Через отверстие осторожно надрывают иглой внутренний листок скорлупной оболочки и отслаивают на небольшом участке (0,5-1 см²).
5. Производят заражение хорионаллантоисной оболочки путём нанесения на неё 0,1-0,2 мл вирусосодержащего материала с помощью пастеровской пипетки или шприца.
6. Окошко в скорлупе закрывают специальной эластичной плёнкой или стерильным покровным стеклом и прикрепляют расплавленным парафином.

Заражённые эмбрионы помещают в термостат в вертикальном положении и инкубируют в течение 2-3 суток, после чего производят вскрытие по следующим правилам:

1. Яйцо помещают на подставку так, чтобы воздушное пространство было наверху, проводится стерилизация места вскрытия.

2. Стерильными ножницами срезают скорлупу по границе воздушного пространства.

3. Пользуясь пинцетом, снимают скорлупную оболочку по границе. Обнажённую хорионаллантоисную оболочку подрезают вдоль края скорлупы. Через образовавшееся отверстие выливают всё содержимое яйца в чашку или лоток.

4. Оставшуюся внутри скорлупы хорионаллантоисную оболочку осторожно извлекают пинцетом и помещают в стерильную чашку с физиологическим раствором. Здесь её расправляют и изучают изменения, поместив чашку на тёмный фон.

Для получения из хорионаллантоисной оболочки материала, содержащего вирус, её нужно измельчить ножницами и затем растереть в ступке с кварцевым стеклом, добавив солевой раствор. Полученную суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10-15 минут и надосадочная жидкость используется в качестве вируссодержащего материала.

1.3.3. Заражение в аллантоиную полость

Для заражения берут эмбрионы 10-11-дневного возраста. Основные этапы заражения:

1. Яйцо помещают на подставку тупым концом кверху и проводят стерилизацию скорлупы над воздушным пространством.

2. В центре тупого конца делают прокол скорлупы с помощью препаровальной иглы.

3. В отверстие вводят иглу шприца, содержащего разведение вируса. Иглу продвигают в вертикальном направлении на 2-3 мм ниже уровня воздушного мешка и затем вводят 0,1-0,2 мл материала.

4. Отверстие в скорлупе заделывают с помощью расплавленного стерильного парафина.

Заражённые эмбрионы выдерживают в термостате обычно в течение 2 суток. Перед вскрытием яйца помещают на ночь в холодильник при 4°C. Вскрытие производится в следующем порядке:

1. Яйцо устанавливается на подставке так, чтобы воздушный мешок находился наверху, скорлупу над ним стерилизуют.

2. С помощью ножниц скорлупу срезают немного выше границы воздушного пространства.

3. Осторожно удаляют пинцетом скорлупную оболочку, после чего хорионаллантоисную оболочку прокалывают пастеровской пипеткой в том месте, где нет сосудов, и насыщают аллантоисную жидкость.

4. Аллантоисную жидкость переносят в стерильную пробирку, а часть засевают в бульон для проверки на бактериологическую стерильность.

Законспектировать. Отчет отправить на эл.почту преподавателя.

Ссылка на видео - заражение куриных эмбрионов:

<https://youtu.be/vn-LLd4x9U4>

Ссылка на видео – техника вскрытия куриных эмбрионов:

<https://youtu.be/tR1m0VJBTf4>